

PENGARUH KOPI TERHADAP KADAR ASAM URAT DARAH

Studi Eksperimen Pada Tikus *Rattus Norwegicus* Galur Wistar

The Influence of Coffee on the Blood Uric Acid Level

An Experiment Study Rattus Norwegicus Wistar Strain Rat



Tesis

**untuk memenuhi sebagian persyaratan
mencapai derajat Sarjana S-2**

Rosa Lelyana

G4A006003

**PROGRAM PASCASARJANA
MAGISTER ILMU BIOMEDIK
UNIVERSITAS DIPONEGORO
SEMARANG
2008**

TESIS
PENGARUH KOPI TERHADAP KADAR ASAM URAT
DARAH

Studi eksperimen pada tikus *Rattus Norwegicus Galur Wistar*

disusun oleh

Rosa Lelyana

G4A006003

akan dipertahankan di depan Tim Penguji

pada tanggal 25 Juli 2008

dan dinyatakan telah memenuhi syarat untuk diterima

Menyetujui,

Komisi Pembimbing

Pembimbing Utama

Pembimbing Kedua

Prof.dr. Siti Fatimah Moeis, M.Sc,Sp.GK

NIP. 130 368067

dr. Noor Wijayahadi, Mkes.PhD

NIP. 132 149 104

Mengetahui,

Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik

Program Pasca Sarjana Universitas Diponegoro

Prof. Dr. H.Soebowo,Sp.PA (K)

NIP. 130 352 549

RIWAYAT HIDUP

A. Identitas

Nama : dr. Rosa Lelyana

Tempat/Tanggal Lahir : Solo/ 3 Juni 1972

Agama : Islam

Nama Orang Tua : Bp. Prof. dr. Soebowo, SpPA (K)

Ibu Suryaningsih

Nama Saudara Kandung :

1. dr. Mada Gautama
2. Grama Wardhana, SH
3. dr. Ariawan Ditya Birawa, Msi. Med, SpOG

Nama Suami : dr. Puguh Riyanto SpKK

Nama Anak :

1. Vito Etenio Ade Laryan SDIT Nasima/ 5-10-1999
2. Raoul Audwin Farant Reynaldi SDIT Nasima/14-1-2002
3. Kalya Trixie Rembun Sekar Sari TKIT Nasima Semarang/28-7-2003

Alamat : Jl. Tampomas Dalam VI/ no. 9 Semarang - 50231

Jl. HOS Cokroaminoto no.84 Ungaran – 50511

Email : rlelyana@gmail.com

Hp : 0815764-5736

B. Riwayat Pendidikan

SD Kristen Gergaji Semarang 1979-1985

SMP Pangudi Luhur Domenico Savio Semarang 1985-1988

SMA Negeri 3 Semarang 1988-1991

Masuk FK UNDIP tahun 1991, lulus tahun 1997

Masuk Magister Biomedik FK Undip bulan September 2006

C. Riwayat Pekerjaan

Dokter PTT Puskesmas Ungaran II (Mapagan) tahun 1998-1999

Dokter PTT Puskesmas Ungaran I (Genuk) tahun 1999-2001

Praktek Swasta 1998-2007

Staf Pengajar Program Studi Ilmu Gizi FK Undip 2006 - sekarang

KATA PENGANTAR

Allhamdullilahhirobil'alamin, puji syukur kami panjatkan ke hadirat Allah S.W.T atas segala karunia-Nya sehingga penyusunan makalah seminar hasil penelitian ini dapat kami selesaikan dengan baik, walaupun masih ada beberapa kekurangan dalam penulisan.

Ucapan terima kasih penulis sampaikan untuk :

1. Prof. Dr.dr. Susilo Wibowo, Msc, SpAnd sebagai Rektor Undip dan sebagai guru saat menempuh studi.
2. Direktur Program Pasca Sarjana Universitas Diponegoro, Prof. Drs. Y. Warella, MPA, PhD yang telah memberikan ijin untuk menempuh Program Pasca Sarjana UNDIP Semarang.
3. Ketua Program Studi Biomedik Prof.dr. Soebowo,SpPA, dan Pof.dr.Edi Dharmana Msc, Ph.D, SpPar(K) serta dr. Kusmiyati DK Mkes sebagai pegelola program Biomedik dan sebagai guru atas arahan dan masukan yang diberikan selama ini.
4. dr. Soejoto, PAK, SpKK(K), Dekan FK UNDIP beserta jajarannya yang telah memberikan kesempatan kepada penulis untuk menempuh pendidikan Program Pasca Sarjana UNDIP serta mantan dekan FK UNDIP Prof.dr.Kabulrachman, SpKK (K) atas kesempatan yang telah diberikan kepada penulis untuk menempuh pendidikan Program Pasca Sarjana UNDIP

5. Prof.dr. HM. Sulchan,Msc, D.Nutr,Sp.GK atas ijin beliau yang pada waktu itu (tahun 2006) menjabat sebagai ketua Program Studi Ilmu Gizi FK Undip dan Prof.Dr.dr. Hertanto, Msc, SpGK (saat itu menjabat sebagai Sekretaris Bidang I Program Studi Ilmu Gizi FK Undip) serta dr.Yekti Wirawani (saat itu sebagai Sekretaris Bidang II Program Studi Ilmu Gizi FK Undip) atas diperkenankannya saya untuk melaksanakan studi S2 Biomedik di FK Undip.
6. Prof. dr. Siti Fatimah Moeis, Msc, SpGK; Prof.Dr.dr.Endang Purwaningsih, MPH ,SpGK; dr.Darmono SS, MPH, SpGK, dr. Niken Puruhita,Msc,SpGK atas masukan yang diberikan selama ini.
7. Prof.dr. Siti Fatimah Moeis, SpGK selaku pembimbing I dan dr. Noor Wijayahadi, Mkes, Ph.D selaku pembimbing II atas bimbingan, arahan dan masukan yang diberikan hingga selesainya makalah seminar hasil dengan baik.
8. Prof.Dr.dr Endang Purwaningsih, MPH,SpGK; dr.Pudjadi SU dan dr. Kusmiyati DK,Mkes selaku penguji, atas masukan, kesabaran, nasehat yang diberikan kepada penulis sehingga tesis ini dapat selesai dengan baik.
9. dr. Puwanto AP, SpPK dan dr. Hardian sebagai narasumber atas arahan, bimbingan, kesabaran, nasehat yang diberikan selama ini sehingga makalah ini dapat terselesaikan dengan baik.
10. Semua staf pengajar di Program S2 Biomedik. Terima kasih atas ilmu yang telah diberikan selama saya menempuh studi.

11. Prof. dr. Soebowo, SpPA sebagai ayah dan guru atas bimbingan, nasehat, arahan, juga kritikan yang diberikan selama menempuh studi. Juga ibu Suryaningsih dan saudara-saudaraku semua atas doa yang diberikan selama ini hingga selesainya penelitian dan studi saya.
12. Teman-teman dosen dan staf administrasi Prodi Ilmu Gizi FK Undip terima kasih atas bantuan, pengertian dan semua yang telah kalian berikan selama saya menempuh studi.
13. Mbak Nata dan mas Dul yang telah banyak membantu dalam hal kelancaran administrasi di Biomedik.
14. Teman-teman S2 Biomedik tahun 2006, eyang dr. HM Purnomo, dr.Qatrunada (bu Kiki), dan Wiralis, STP (mbak Wir). Terima kasih atas semua yang pernah diberikan selama menempuh studi yang tidak hanya menganggap sebagai teman tetapi juga sebagai adik dan anak. Juga mbak dr. Widyastuti, dr. Arifiana, dr. Peni terima kasih atas hiburan dan motivasinya.
15. Mbak Tika, Bp.Ngatiman, mas Solichin, mbak Fitri dari Laboratorium Biologi MIPA, Unnes. Terima kasih atas semuanya.
16. Suami dr. Puguh Riyanto SpKK dan putra-putriku kak Vito, dik Raoul, dik Rembun. Terima kasih atas kesabaran dan semua yang telah kalian berikan selama ini.
17. Semua pihak yang telah banyak membantu selama menempuh studi ini, semoga Allah S.W.T membalas semua kebaikan bapak/ibu dan teman-teman semua yang telah memberikan sumbangsih selama saya menempuh studi.

Akhir kata, saran membangun sangat kami harapkan demi penyempurnaan penulisan maupun kemungkinan bila ada pelaksanaan penelitian sejenis di masa mendatang.

Semarang, Juli 2008

Rosa Lelyana

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
RIWAYAT HIDUP.....	iii
KATA PENGANTAR.....	v
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR GAMBAR.....	xi
DAFTAR LAMPIRAN.....	xii
DAFTAR SINGKATAN.....	xiii
ABSTRAK.....	xiv
Bab I. PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang Penelitian.....	1
1.2 Perumusan Masalah.....	4
1.3 Tujuan Penelitian.....	4
1.4 Manfaat Penelitian.....	5
1.5 Keaslian Penelitian.....	5
Bab 2. TINJAUAN PUSTAKA.....	7
2.1 Kopi.....	7
2.1.1. Kafein.....	8
2.1.2. Polyphenol.....	16
2.2. Asam Urat.....	26
2.3. Antioksidan	35

Bab 3. KERANGKA TEORI DAN KERANGKA KONSEP.....	39
3.1. Kerangka Teori.....	39
3.2. Kerangka Konsep.....	40
3.3. Hipotesis.....	40
Bab 4. METODE PENELITIAN.....	41
4.1 . Rancangan Penelitian.....	41
4.2. Populasi dan Sampel.....	42
4.3. Kriteria Inklusi.....	42
4.4. Kriteria Eksklusi.....	42
4.5. Variabel Penelitian.....	43
4.6. Perhitungan dosis.....	44
4.7. Alat dan Bahan.....	46
4.8 Prosedur Penelitian.....	46
4.9. Waktu dan Tempat Penelitian.....	49
4.10. Analisis Data	49
Bab 5. HASIL PENELITIAN.....	50
Bab 6. PEMBAHASAN.....	60
Bab 7. SIMPULAN DAN SARAN.....	65
7.1. Simpulan.....	65
7.2. Saran.....	65
DAFTAR PUSTAKA.....	66
LAMPIRAN.....	76

DAFTAR TABEL

Tabel	Hal
Tabel 1. Kadar Kafein yang terdapat dalam setiap cangkir kopi	9
Tabel 2. Beberapa kelas utama senyawa phenolik.	18

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Hal
1. Struktur kimia kafein	8
2. Kemiripan struktur kimia pada xanthin, kafein, teophylline, theobromine	9
3. Jalur degradasi kafein dalam membentuk asam urat dengan bantuan xanthine oxidase	11
4. Struktur kimia <i>chlorogenic acid</i>	19
5. Struktur kimia asam urat	27
6. Penguraian basa purin	29
7. Penguraian basa purin melalui <i>cellular breakdown</i>	30
8. Jalur penghambatan <i>xanthine oxidase</i> terhadap pembentukan asam urat oleh allopurinol	33
9. Perubahan struktur kimia pembentukan asam urat	35

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Output SPSS

Lampiran 2. Dokumentasi penelitian

Lampiran 3. *Ethical clearance*

Lampiran 4. Hasil analisis kopi robusta yang digunakan dalam penelitian

DAFTAR SINGKATAN

AMP : *adenosine monophosphate*

CGA : Chlorogenic Acid

GMP : *guanosine monophosphate*

γ -GT : *gamma-glutamyl transpeptidase*

H₂O₂ : hidrogen peroksida

GPx : Glutathion Peroksidase

IMP : *inosine monophosphate*

LCS : Liquor Cerebro Spinalis

PRPP : *phosphoribosyl pyrophosphate*

XO : Xanthine Oxidase

ABSTRAK

Latar Belakang : Kopi merupakan salah satu minuman kegemaran masyarakat dunia. Masih ada kontroversial dari efek kopi dimana kopi dapat meningkatkan atau menurunkan kadar asam urat. Penelitian tentang pengaruh kopi terhadap kadar asam urat darah belum pernah dilakukan di Indonesia.

Tujuan : Membuktikan bahwa kopi mampu menurunkan kadar asam urat serum darah pada tikus Wistar dengan hiperurikemia

Metode : Suatu studi eksperimen *pre and post test design* dilakukan pada 24 tikus Wistar yang secara random dibagi menjadi 4 kelompok. Pada minggu pertama dan minggu ke-2 semua kelompok diberi pakan tinggi purin. Pada minggu ke-2 semua kelompok juga diberikan larutan kopi. Pada kelompok perlakuan 1 diberikan larutan kopi 0,36 ml/hari, sedangkan kelompok lainnya diberikan : 0,72 ml/hari ; 1,14 ml/hari dan 2,16 ml/hari. Kadar asam urat darah diukur sebelum pemberian pakan tinggi purin, sebelum serta setelah pemberian larutan kopi. Kadar asam urat darah diperiksa dengan menggunakan spektrofotometri. Analisis data menggunakan uji *t*-berpasangan dan *One Way Anova*.

Hasil : Ada penurunan kadar asam urat setelah perlakuan pada kelompok yang memperoleh larutan kopi 0,72ml/hari dan 2,16 ml/hari.

Kesimpulan : Larutan kopi dapat menurunkan kadar asam urat pada tikus percobaan.

Kata kunci : Kopi, kadar asam urat

ABSTRACT

Background : Coffee is one of the several favorite drink in the world. There is still a controversial effect of coffee, whether coffee could increase or decrease the blood uric acid level. Study about the influence of coffee on the blood uric acid level has never been conducted in Indonesia.

Objective : To prove that coffee could decrease blood uric acid level in the hyperuricemia *Rattus Norwegicus Wistar Strain Rat*.

Method : A pre and post test design that has been done on 24 wistar strain rats that were divided randomly into 4 groups. On the 1st week and 2nd week all groups were fed high purin diet. On the 2nd week all group were given coffee,too. Group 1 were given 0.36 ml coffee solution/ day and the other group were given 0.72 ml/ day; 1.14 ml/ day and 2.16 ml/ day. Blood were drawn at the beginning before high purin diet were given, before and after coffee treatment. The blood uric level were examined using spectrophotometry. Data were analyzed using Pair- t test and One Way Anova.

Result : There were decreased blood uric acid level in the group receiving 0,72 ml /day and 2,16 ml coffee solution/day.

Conclusion : Coffee is able to reduce blood uric acid level in experimental rats.

Key Words : Coffee, Blood Uric Acid Level

BAB 1

PENDAHULUAN

1.Latar Belakang Penelitian

Kopi merupakan salah satu alternatif minuman pilihan yang sangat digemari masyarakat Indonesia maupun negara lain selain teh. Kegemaran mengonsumsi kopi sudah dilakukan turun temurun sejak jaman nenek moyang, bahkan dalam setiap jamuan makan baik acara formal maupun non formal, sajian kopi hampir tidak pernah dilupakan. Kondisi ini sama dengan di luar negeri, di Amerika misalnya, sebagian besar masyarakat menyukai kopi, sehingga istilah *coffe break* sampai saat ini masih digunakan dan menjadi *ikon* untuk menyatakan waktu istirahat dan jam makan telah siap.¹

Sebagian orang mengonsumsi kopi sebagai salah satu minuman kegemaran, sedang sebagian orang tidak menyukai minum kopi karena khawatir efek kopi terhadap kesehatan.²⁻⁴ Menurut masyarakat awam, kopi mampu menghilangkan rasa lelah dan terhindar dari rasa mengantuk, sedang menurut hasil penelitian ilmiah, kopi mampu menurunkan risiko diabetes mellitus,^{5,6} penyakit kardiovaskuler,⁷⁻⁹ kanker¹⁰ serta mampu menurunkan kadar asam urat darah.¹¹⁻¹³ Hal tersebut karena kandungan polyphenol yaitu *chlorogenic acid* di dalam kopi⁵⁻¹⁴, namun tetap perlu diperhatikan berapa cangkir kopi perhari yang diminum agar aman dan memberi efek baik bagi tubuh.^{1-3,15-17}

Kopi merupakan salah satu jenis polong-polongan dengan kandungan senyawa kompleks diantaranya kafein¹⁵⁻¹⁷ dan *chlorogenic acid*.^{5-7,10-14} Kafein termasuk alkaloid ($C_8H_{10}O_2N_4.H_2O$) dengan rumus kimia 1,3,7-trimethylxanthine.¹⁻³ Kafein bersifat diuretik,¹⁵⁻¹⁸ sedangkan *chlorogenic acid* merupakan senyawa polyphenol yang bekerja sebagai antioksidan kuat di dalam kopi.^{5,19-26} Dalam 1 cangkir kopi robusta dengan 10 g bubuk kopi mengandung sekitar 100 mg kafein dan 200 mg *chlorogenic acid*.^{17,19,20,27,28}

Efek kafein dalam menghambat reseptor adenosin menyebabkan timbulnya beberapa efek kurang baik bagi tubuh.^{1-4,15-17} Salah satu efek kopi yang masih menjadi bahan kontroversi adalah efek terhadap peningkatan atau penurunan kadar asam urat. Di satu sisi, berdasar teori bahwa kopi dengan kandungan kafein akan meningkatkan pembentukan asam urat. Kafein (1,3,7 trimethylxanthin) akan mengalami degradasi menjadi 1,3 dimethylxanthin; 3,7 dimethylxanthin; 1,7 dimethylxanthin yang kemudian membentuk methylxanthin. Xanthin dengan bantuan enzim xanthin oxidase akan membentuk asam urat.^{3,4,18,29} Di sisi lain, menurut beberapa hasil penelitian senyawa polyphenol yang terkandung di dalam kopi diantaranya *chlorogenic acid*^{14,19,24,30,31} mampu menghambat aktivitas enzim xanthin oxidase sehingga menurunkan kadar asam urat.^{23,32} Hal ini sesuai dengan hasil studi di Jepang dimana peminum 3-5 cangkir kopi perhari mempunyai kadar asam urat

rendah.¹¹ Selain itu hasil penelitian Yanagimoto menunjukkan kandungan antioksidan kopi diantaranya *chlorogenic acid* mampu menghambat kerusakan oksidatif.²² Pada studi yang dilakukan secara in vivo dan in vitro, hasil penelitian Daglia M membuktikan aktivitas antiradikal spesifik dari kopi mampu menurunkan kadar asam urat,²³ demikian pula hasil penelitian yang dilakukan Choi HK.¹² Hasil studi Hyon K menyimpulkan bahwa total asupan kafein, termasuk kopi tidak berhubungan dengan risiko kenaikan kadar asam urat. Kondisi dimana terjadi peningkatan kadar asam urat dalam darah disebut hiperurikemia, dimana nilai normal asam urat adalah 2,1-8,4mg/dL.^{13,15,29,33}

Asam urat disintesis dalam tubuh manusia.^{15,29,33} Asupan makanan tinggi purin mampu meningkatkan kadar asam urat.^{15,29,33,34} Adanya manfaat dari konsumsi kopi terhadap penurunan kadar asam urat akan menguntungkan peminum kopi karena itu hal ini perlu dikaji lebih lanjut. Penelitian tentang pengaruh kopi terhadap kadar asam urat belum pernah dilakukan di Indonesia baik pada hewan coba maupun pada manusia, oleh karena itu penelitian ini diawali dengan menggunakan hewan coba. Pemilihan hewan coba adalah tikus galur Wistar karena tahan terhadap perlakuan pada penelitian. Bahan kopi yang digunakan dalam penelitian ini adalah kopi jenis robusta karena menurut penelitian sebelumnya, kandungan senyawa polyphenolnya lebih tinggi dibandingkan kopi arabika atau tanaman lain.^{5,14,22,23,31}

1.2 Permasalahan Penelitian

Berdasarkan uraian latar belakang di atas maka dapat dirumuskan masalah penelitian sebagai berikut : apakah pemberian berbagai dosis kopi akan menurunkan kadar asam urat serum darah hewan coba *Rattus Norwegicus Galur Wistar* yang telah dibuat hiperurikemia?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Membuktikan bahwa pemberian kopi pada hewan coba *Rattus Norwegicus Galur Wistar* hiperurikemia dapat menurunkan kadar asam urat serum darah.

1.3.2. Tujuan Khusus

1. Membuktikan adanya penurunan kadar asam urat serum *Rattus Norwegicus Galur Wistar* yang mendapat pakan tinggi purin dan kopi selama 7 hari
2. Membuktikan adanya pengaruh pemberian berbagai dosis kopi terhadap kadar asam urat serum *Rattus Nowergicus galur Wistar* yang mendapat diet tinggi purin selama 7 hari dimana pemberian kopi dengan dosis lebih besar akan menyebabkan penurunan kadar asam urat yang lebih besar dibanding pemberian kopi yang dosis lebih kecil.

1.4. Manfaat Penelitian

1.4.1. Bagi masyarakat : penelitian ini akan memberikan pengetahuan tambahan tentang pengaruh konsumsi kopi terhadap kadar asam urat.

1.4.2. Bagi ilmu pengetahuan : penelitian ini akan memberikan informasi dasar bagi penelitian lebih lanjut.

1.5. Orisinalitas Tesis

Berdasarkan hasil penelusuran pustaka melalui internet, penelitian tentang pengaruh pemberian kopi terhadap kadar asam urat serum belum pernah dilaporkan sebelumnya.

Penelitian sebelumnya yang pernah dilakukan tentang pengaruh kopi terhadap kadar asam urat adalah sebagai berikut:

No	Nama Peneliti	Variabel tergantung	Judul Penelitian	Desain Penelitian	Variabel bebas	Hasil Penelitian
1	Kiyohara C, Kono S, Honjo S, Todoroki I, Sakurai Y, Nishiwaki M,et al.,1999 ¹¹	Kadar asam urat serum	<i>Inverse Association Between Coffee Drinking and Serum Uric Acid Concentration in Middle Age Japanese males.</i>	Kohort Prospektif	Minum Kopi	Peminum kopi berhubungan dengan kadar asam urat serum rendah

No	Nama Peneliti	Variabel tergantung	Judul Penelitian	Desain Penelitian	Variabel bebas	Hasil Penelitian
2	Choi HK, Curhan G, 2007 ¹²	Kadar asam urat serum pria dewasa usia di atas 20 tahun.	<i>Coffee, Tea, Caffeine Consumption and Serum Uric Acid : The Third National Health and Nutrition Examination Survey</i>	Kohort Prospektif	Konsumsi kopi, teh	Konsumsi kopi menurunkan risiko perkembangan gout dan frekuensi hiperurikemia, sedang teh tidak.
3	Choi HK, Willet W, Curhan G, 2007 ¹³	Kadar serum asam urat pria sehat tanpa gout	<i>Coffee consumption and risk of incident gout in men</i>	Kohort Prospektif	Kafein pada minuman kopi dan teh	Total asupan kafein dari seluruh sumber makanan dan asupan teh tidak berhubungan dengan risiko gout.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kopi

Kopi mulai dikenal sejak abad ke 7 dan telah tumbuh di dekat Laut Merah. Pada abad ke 16 kopi ditemukan di daratan Afrika, yaitu di Yaman dan Ethiopia. Tahun 1669, kopi mulai dikenalkan ke bangsa Eropa dan beberapa tahun kemudian orang-orang Belanda memperkenalkan kopi ke pulau Jawa. Kopi arabika dikenal sejak abad ke 13, sedang kopi robusta dikenal baru akhir abad ke 19.¹

Secara taksonomi, kopi termasuk famili *Rubiaceae*, genus *coffea*. Spesiesnya ada 2 yaitu *coffea arabica* (arabika) dan *coffea canephora* (robusta). Kopi robusta tumbuh di tempat yang berbeda dengan kopi arabika, yaitu didaerah tropis dimana kopi arabika tidak bisa tumbuh. Harga kopi robusta lebih murah daripada kopi arabika namun rasanya kurang enak/ lebih pahit bila dibanding kopi arabika.²⁻⁴

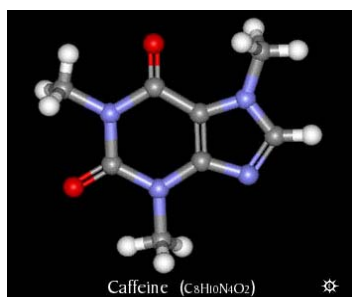
Menurut beberapa hasil penelitian, mengkonsumsi kopi dapat menurunkan insidens dari berbagai macam penyakit diantaranya diabetes mellitus tipe 2^{5,6}, kardiovaskuler,⁷⁻⁹ kanker,¹⁰ serta menurunkan kadar asam urat.¹¹⁻¹³

Kandungan kopi

2.1.1. Kafein

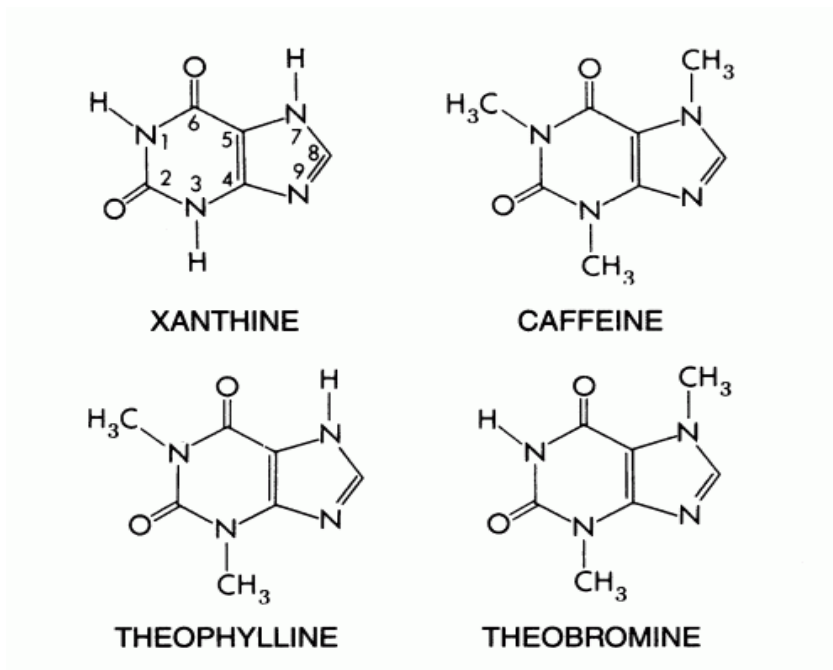
Pengertian dan struktur kimia kafein

Kafein adalah suatu senyawa kimia yang banyak terdapat dalam minuman seperti kopi, teh, *soft drink* dan makanan seperti *chocolate*. Warna senyawa keputihan dan bila kehilangan hidrasi air akan mengalami pengkristalan dalam jangka lama.¹⁻⁴ Struktur kimia kafein adalah 1,3,7 trimethylxanthin dan termasuk dalam molekul xanthin. Gugus methylnya berikatan dengan ketiga hidrogen dan nitrogen pada cincin xanthin.¹⁻⁴



Gambar 1. Struktur kimia kafein^{1,2}

Kafein merupakan alkaloid putih dengan rumus senyawa kimia $C_8H_{10}N_4O_2$, dan rumus bangun 1,3,7-trimethylxanthine. Kafein mempunyai kemiripan struktur kimia dengan 3 senyawa alkaloid yaitu *xanthin*, *theophylline*, dan *theobromine*.^{1,2,16,18}



Gambar 2. Kemiripan struktur kimia pada Xanthin, Kafein, Teophylline dan Theobromine^{2,4}

Kadar kafein dalam kopi

Kafein yang terkandung dalam biji kopi sekitar 0,7-1,5% sedang pada daun teh sekitar 1,5-3%^{1,3} dan pada minuman berenergi dapat mengandung lebih banyak lagi kafein. Kafein terkandung dalam 60 spesies tanaman termasuk biji kopi.^{3,4}

Tabel 1. Kadar Kafein yang terdapat dalam setiap cangkir kopi (berdasarkan cara penyajian)^{3,4}

Cara Penyajian Kopi	Kadar standar kafein dalam setiap cangkir kopi (mg)
Kopi <i>ground</i>	90
Kopi <i>instant</i>	65-100
Kopi <i>decaffeinated</i>	3-4
Kopi <i>drip</i>	110
Kopi <i>brewed</i>	8-135

Kadar kafein yang terkandung dalam kopi tergantung :

1. Tempat pertumbuhan kopi dimana pada kopi robusta yang tumbuh di Indonesia dan Afrika kadar kafein mencapai 2,2%, sedang pada kopi Arabica yang tumbuh di Amerika Selatan mengandung sekitar 1,1% kafein.¹⁹
2. Cara kopi disajikan juga menentukan kandungan kopi.¹⁹

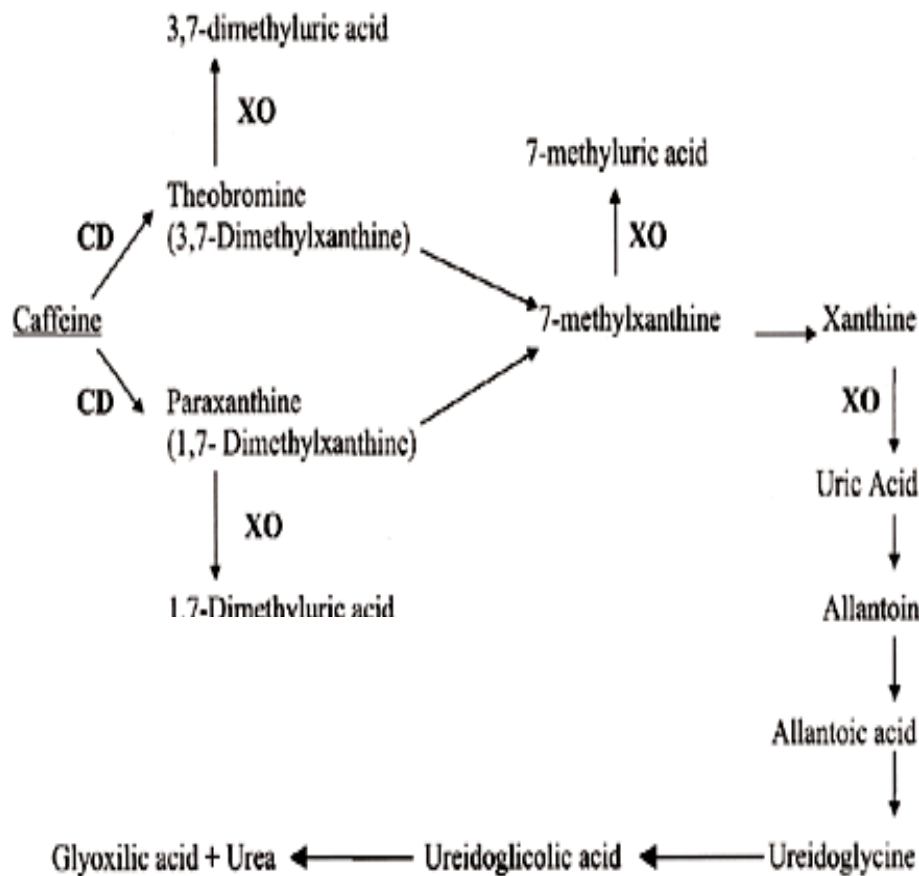
Dosis rekomendasi kafein

Anak-anak usia lebih dari 12 tahun dan dewasa dosis yang direkomendasikan adalah 100-200mg, namun pemberian tidak lebih dari tiap 3-4 jam. Pada pemberian dosis tunggal 200-250mg^{2,16}, tidak boleh diberikan sebelum tidur atau kurang dari 6 jam sebelum tidur. Dosis 200-250 mg per hari jarang menyebabkan *adverse reactions* pada orang dewasa sehat. Bagi anak dibawah 12 tahun minum kopi tidak direkomendasikan.¹⁶ Kadar plasma dari kafein 0,5-1,5 mg/l. ¹Waktu paruh methylxanthin 0,7-1,2 jam pada hewan, sedang pada manusia 2,5-4,5 jam.^{1,2,16,17}

Absorpsi, distribusi dan metabolisme kafein

Setelah kopi dikonsumsi, akan didistribusikan ke seluruh tubuh oleh aliran darah dari traktus gastro intestinal dalam waktu sekitar 5-15 menit.²¹ Kafein dimetabolisir di liver oleh enzim cytokrom P450 menjadi 3,7 *dimethyl-* (theobromin) dan *monomethylxanthines*, 1,3 *dimethyl* (theophyllin) dan *monomethyl uric acids*, trimethyl- and *dimethylallantoin*, serta *uracil derivat*.^{1,2,16} Absorpsi kafein dalam saluran pencernaan mencapai kadar 99% kemudian kadarnya dalam aliran darah akan mencapai puncak dalam waktu 45 - 60 menit setelah mengalami proses

pencernaan. Waktu paruh kafein 5-6 jam pada orang dewasa, dan kadar kafein akan berkurang dalam waktu 6 jam dengan sangat perlahan.^{1,16,17} Pada hewan, kafein diabsorpsi secara lengkap, namun absorpsinya kurang lengkap bila dikonsumsi dalam bentuk kopi. Kafein sangat efektif bekerja dalam tubuh sehingga memberikan efek yang bermacam macam bagi tubuh. Efek toksik kopi akan muncul bila dikonsumsi sangat banyak dimana LD₅₀ pada hewan percobaan tikus sekitar 200 mg/kg.^{1,16}



Gambar3. Jalur Degradasi Caffein dalam membentuk Asam Urat dengan Bantuan Enzym Xanthine Oxidase (XO)⁴

Pada tubuh xanthin merupakan hasil pemecahan produk adenin dan guanin, yaitu 2 basa purin yang merupakan kunci utama dari DNA dan RNA. Adenin juga basa purin dalam simpanan energi molekul ATP dan *second messenger* cAMP.^{4,18} Adenin dapat dideaminasi menjadi hipoxanthin, lalu teroksidasi menjadi xanthin dan teroksidasi lagi menjadi asam urat untuk diekskresikan. Hipoxanthin dapat *directly* lagi untuk membentuk AMP, GMP, atau asam nukleat.^{1,4,18}

Adenosin merupakan molekul adenin yang menempel pada molekul gula ribose atau deoxyribose. Adanya kemiripan struktur kimia antara adenin dari adenosin dengan senyawa kafein merupakan kunci bagaimana kafein bekerja, dimana kemiripan struktur kafein akan berkompetisi dengan adenin sebagai sustrat untuk menempati enzim adenosin reseptor.¹ Semua sel tubuh termasuk neuron mempunyai reseptor adenosin.³ Adenosin bekerja sebagai neurotransmitter di otak, tapi tidak dikeluarkan dari sinaps. Molekul kafein mempunyai cukup kemiripan terhadap adenin untuk berikatan dengan reseptor adenosin, tapi tidak cukup kemiripan untuk merangsang reseptor tersebut.^{1,3,4} Jadi titik tangkap utama aktivitas kafein adalah sebagai penghambat reseptor adenosin. Cyclic AMP bekerja sebagai molekul *signalling* sel yang akan mentransmisikan sinyal dari membran sel ke interior sel dalam nukleus. cAMP dimetabolisir oleh phosphodiesterase, yaitu enzim yang memecah ikatan diester karbon 5 dan karbon 3 ribose.⁴ Kemiripan kafein dengan adenin untuk berikatan dengan phosphodiesterase sehingga kafein dapat menghambat molekul phosphodiesterase untuk mencegah dari hidrolisis (inaktivasi)

cAMP. Efek ini hanya terjadi di dalam tubuh karena kebutuhan untuk mencapai efek yang bermakna akan lebih besar dari kadar plasma kafein yang dicapai oleh peminum kopi, karena itu dibutuhkan 20 kali kafein yang lebih banyak untuk menghambat phosphodiesterase. Empat puluh kali kafein yang lebih banyak untuk menghambat reseptor GABA. Seratus kali kafein yang lebih banyak untuk memobilisasi kalsium intraseluler seperti yang dibutuhkan untuk menghambat reseptor adenosin.^{1,4,23,24}

Adenosin merupakan neuromodulator bukan neurotransmitter. Adenosin tidak disimpan di vesikel tidak juga sebagai bolus dalam respon terhadap depolarisasi membran presinaptik. Adenosin terakumulasi di cairan ekstraseluler sebagai hasil fisiologi sel karena itu dikeluarkan dari neuron maupun sel glial.^{1,23}

Adenosin diproduksi sebagai hasil produk penggunaan ATP (sebagai sumber energi untuk metabolisme seluler). Adenosin bekerja pada reseptor adenosin untuk menghambat pengeluaran neurotransmitter. Reseptor adenosin diklasifikasikan sebagai A₁, A_{2A}, A_{2B} dan A₃, walaupun hanya A₁, dan A_{2A} yang bermakna sebagai neurotransmitter, sedang A_{2b} dan A₃ terdapat pada jaringan perifer di luar otak.²⁻⁴

Efek farmakologi kafein sangat bervariasi.^{1,16,17} Hambatan pada enzim akan meningkatkan kadar *second messenger* dan *cyclic AMP* di dalam sel. Kafein mampu menembus barier darah otak orang dewasa dan hewan. Pada ginjal kafein bekerja sebagai diuretik ringan. Pada bayi baru lahir kadar kafein antara plasma darah dan LCS sama, jadi tak ada placentar barier untuk kafein.^{2,16} Kadar kafein yang tinggi terdapat pada bayi prematur dengan ibu yang mengkonsumsi kafein dalam jumlah

banyak. Kadar kafein pada saliva merupakan indeks nyata dari kadar kafein pada plasma, yang mencapai 65 - 85% dari kadar plasma.¹⁶

Kadar puncak kafein sekitar 0,25 - 2 mg/l bila dosis kafein pada secangkir kopi yaitu 0,4 – 2,5 mg/kg. Untuk dosis lebih rendah dari 10 mg/kg, kafein mempunyai waktu paruh berkisar dari 0,7 – 1,2 jam pada tikus/ rat dan mencit /mouse, 3 - 5 jam pada monyet dan 2,5 – 4,5 jam pada manusia.^{1,16,17} Waktu paruh kafein pada neonatal meningkat karena rendahnya aktivitas sitokrom P450 dan belum matangnya jalur demethylasi dan jalur acetylas. Waktu paruh kafein sekitar 80 ± 23 jam pada bayi baru lahir yang *mature* dan mencapai 100 jam pada bayi *premature*. Waktu paruh kafein menurun 2,6 jam pada bayi usia 3- 5 dan 5-6 bulan.¹

Clearance kafein rendah pada bayi usia 1 bulan sampai bayi yang lebih besar (31 ml/kg/jam), pada usia 5 – 6 bulan *clearence* kafein menjadi 331 ml/kg/jam dan pada orang dewasa 155 ml/kg/jam.¹⁻³

Pada tikus, 40% dari hasil metabolit kafein adalah derivat trimethyl sedang pada manusia kurang dari 6%. Methyl demethylasi menyebabkan pembentukan paraxanthine. Beberapa metabolit kafein mempunyai aktivitas farmakologi dan aktivitas biologi yang harus dipertimbangkan saat mengkonsumsi kopi, demikian juga 1,3-dimethylxanthine (theophylline) dan 1,7-dimethylxanthine (paraxanthine). Pada *rodent*, paraxanthine merupakan metabolit utama dalam plasma.^{2,3}

Efek kafein bagi kesehatan

1. Sistem Syaraf Pusat¹⁶

Kafein dalam 100-200 mg setara dengan 2 cangkir kopi akan menurunkan rasa letih melalui mobilisasi asam lemak, memperbaiki kekuatan otot, meningkatkan vitalitas dan kesiagaan mental, serta fungsi koordinasi seseorang akibat inhibisi dari resptor adenosin pada cortex cerebri. Selain itu juga mempunyai efek gangguan tidur.

Pada seseorang yang mengkonsumsi kopi secara teratur, dan bila konsumsi dikurangi, maka menyebabkan berlebihnya darah di otak dan sakit kepala.

2. Sistem Kardiovaskuler^{2,7,8,16}

Kafein akan menyebabkan Inotropik dan Kronotropik pada jantung. Meningkatkan efek vasodilatasi arteri, namun pada asupan kafein 250 mg akan menyebabkan efek vasokonstriksi dari pembuluh darah, sehingga akan menurunkan aliran darah central sebanyak 20-30%, karena itu digunakan untuk terapi migrain/ *headache*.

3. Sistem Urinaria^{1,16}

Efek diuretik/ diuresis akan terjadi pada peminum kopi awal namun pada peminum kopi habitual yang mengkonsumsi beberapa cangkir kopi sehari akibat adanya toleransi terhadap kafein, maka efek diuresis akan dikurangi.

4. Sistem Gastrointestinal^{1,5}

Meningkatkan sekresi gaster karena kafein mengandung senyawa asam diantaranya *caffeic acid* dan *chlorogenic acid*.

5. Meningkatkan kadar plasma asam lemak bebas, kortisol dan epinefrin serta keluarnya insulin.³
6. Meningkatkan metabolisme tubuh 3-4% melalui penurunan aliran darah cerebral dan tak ada toleransi untuk hal ini.¹⁶

Interaksi kafein dengan obat atau makanan

Selama ini kafein dapat digunakan sendiri atau bersama obat lain.¹⁶ Kombinasi kafein dengan obat-obatan lain akan meningkatkan efektivitas obat, misalnya :¹⁶

1. Kombinasi dengan alkohol menyebabkan gangguan gastrointestinal (*nausea* dan *vomitus*)^{3,16,28}
2. Kombinasi dengan besi, akan menghambat absorpsi besi sehingga suplemen besi sebaiknya dikonsumsi satu jam sebelum atau dua jam sesudah mengkonsumsi kafein.³
3. Kombinasi dengan *dekongestan phenylpropanolamine*, meningkatkan tekanan darah.^{22,16}

2.1.2. Polifenol Pada Kopi

Kopi merupakan minuman utama penduduk dunia dengan kandungan antioksidan terbanyak.^{2,19-23} Kopi mengandung senyawa polyphenol total sekitar 200-550mg per cangkir.²³⁻²⁷ Kandungan antioksidan pada kopi sekitar

26 %, sedangkan buah berry 25%, teh 23%, anggur 13% dan sayuran 6% dari seluruh total antioksidan.^{19,24-27,30}

Aktivitas antioksidan total dari kopi juga lebih besar dibandingkan aktivitas antioksidan dari beta-carotene (0,1 %), alpha-tocopherol (0,3%), dan vitamin C (8,5%) serta antioksidan lain.^{5,8-10,14,30}

Kopi merupakan golongan tanaman fitokimia disebut juga *plant phenols (Flavonoid polyphenolics)*.⁹ *Plant phenols* adalah senyawa kimia yang berasal dari tanaman dan mengandung antioksidan yaitu *cinnamic acids*, *benzoic acids*, *flavonoids*, *proanthocyanidins*, *stilbenes*, *coumarins*, *lignans*, *lignins* serta *chlorogenic acid*. Diantara senyawa tersebut yang paling banyak terdapat di dalam kopi adalah *chlorogenic acid*.^{5,9,28} Senyawa phenol mempunyai aktivitas biologi sebagai antioksidan yang poten secara in vitro sehingga mampu melindungi DNA, lipid dan protein dengan melawan radikal bebas yang merusak secara in vivo, sehingga mampu mengurangi risiko terjadinya penyakit kronik.²¹⁻²³ Senyawa polyphenol merupakan senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan dari adaptasi tanaman terhadap kondisi stress lingkungan terhadap radiasi sinar ultra violet atau agresi pathogen. Senyawa polifenol terdapat pada buah-buahan, sayur-sayuran, sereal, *legume*, teh dan kopi.^{5,8,14} Senyawa ini bersifat protektif terhadap penyakit degeneratif kronik. Senyawa polifenol dikelompokkan menurut struktur dasar kimia cincin fenol, dan subklas menurut struktur dasar yang terkait dengan bentuk karbohidrat dan polymerisasi.⁸

Hasil penelitian di Norwegia pada tahun 2004 menunjukkan minum kopi dalam jumlah 480 ml perhari merupakan kontributor utama asupan antioksidan total pada diet penduduk Norwegia. Pada studi aktivitas antioksidan total dari kandungan phenol dalam berbagai minuman, menunjukkan kopi merupakan kontributor utama antioksidan daripada minuman lain, seperti *cola*, *cocoa*, *beer*, teh hijau, teh hitam, atau teh herbal, jus buah, es *lemon tea*. Hal tersebut karena adanya *chlorogenic acid* di dalam kopi.^{5,28,30-32} Kopi sebagai sumber utama *phenolic acid* daripada teh hitam dan teh hijau, dimana kandungan *phenolic acid* dari kopi adalah 97mg/100 g sementara kandungan *phenolic acid* pada teh adalah 30-36mg/100g.³⁰⁻³² Jadi aktivitas antioksidan kopi lebih besar daripada minuman lainnya, karena *chlorogenic acid* sebagai senyawa intrinsik dan senyawa yang terbentuk selama *roasting* seperti melanoidins serta senyawa lain yang belum teridentifikasi.⁵

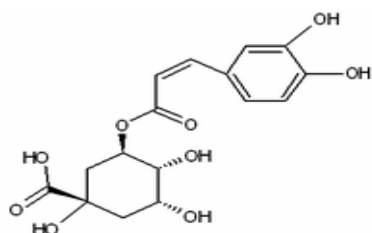
Tabel 2. Beberapa kelas utama senyawa phenolik.^{8,14}

Klas dan Subklas	Contoh senyawa spesifik
A. Senyawa non flavonoid	Asam hydroxycinamic
1. Asam phenolik	Asam gallic
2. Asam benzoic	Asam koumarik, asam kafeik, asam ferulik
3. Asam hidroxicinamic	Metairesinol secoisolariciresinol
4. Lignan	
B. Senyawa Flavonoid	Chatechin, gallocatechin
1. Flavanol	Glycitein
2. Isoflavon	

Senyawa phenolik yang terdapat di dalam biji kopi selain *chlorogenic acid* diantaranya adalah *hydroxy-cinnamic acid*, *caffeoylquinic acid*, *feruloylquinic acid*, dan *dicafeoylquinic acid*, *tannin*, *antocyanin*.^{14,35,36}

Chlorogenic acid

Chlorogenic acid merupakan keluarga esters yang dibentuk antara trans cinnamic acids dan quinic acid^{14,35} dan merupakan senyawa phenolik utama di dalam kopi yang banyak ditemukan di tanaman lain yang didapatkan dari buah dan daun^{14,35}



Gambar 4. Struktur kimia *Chlorogenic acid*¹⁴

Senyawa ini telah dikenal sejak lama sebagai antioksidan. Senyawa ini mampu memperlambat pengeluaran glukosa ke aliran darah setelah makan. dan lebih banyak terdapat dalam kopi robusta daripada kopi arabika.^{5,6} Faktor-faktor yang mempengaruhi kandungan *Chlorogenic acid* di dalam kopi^{14,31}

1. Derajat Kematangan

Kandungan total CGA (*Chlorogenic Acid*) dan komposisi CGA bervariasi tergantung kematangan buah, juga variasi spesies. Kandungan *Chlorogenic*

acid akan meningkat sampai buah kopi matang. Kadar *chlorogenic acid* pada materi dasar kering bervariasi dari 4 – 8,4 % untuk kopi arabika, dan 7 - 14.4 % untuk kopi robusta.^{5,14,31}

2. Pada kopi *immature* kandungan total 8.7 % CGA (materi kering) berasal dari biji hijau gelap, sedang biji kopi yang terlalu matang kadar CGA turun sampai 1.3 %. Hal tersebut terjadi karena buah yang belum matang lebih mudah teroksidasi sedangkan pada buah matang kurang mudah teroksidasi karena mekanisme pertahanan melawan stress oksidasi pada buah matang lebih efisien.³¹
3. Perbedaan metodologi analisis kandungan *chlorogenic acid* juga faktor perbedaan variasi dari *high resolution chromatographic methods*.³¹
4. Genotype kopi/ genetik/ spesies .^{14,31}
5. Kondisi geografi (berhubungan dengan faktor genetik, cuaca, iklim, jenis tanah dan daerah perkebunan) Cuaca dingin, kondisi stress akibat banyak sinar matahari dan banyak air akan meningkatkan kandungan senyawa phenolik tidak hanya pada tanaman kopi namun juga pada tanaman lain.^{8,14,31,35}

Efek biologi *Chlorogenic acid*

Sebagai antioksidan dan penghambat aktivitas perangsang tumor dan pada kadar tinggi yaitu 100 µg/L, tidak menghambat aktivitas 5-lipoxygenase dari ionophore yang merangsang lekosit polymorphonuclear.³⁵

Chlorogenic acid sebagai antivirus²⁶, antibakteri²⁷, antifungi³⁶ serta mempunyai efek samping yang relatif rendah, dan tidak menyebabkan resistensi antimikroba. Sering digunakan pada industri makanan dan farmasi. *Chlorogenic acid* telah terbukti secara in vitro pada studi hewan mampu menghambat hydrolysis enzim glucose-6-phosphate secara *irreversible*.^{5,6} Mekanisme ini menyebabkan *chlorogenic acid* mampu mengurangi hepatic glycogenolysis (transformasi dari glycogen menjadi glukosa) serta mengurangi absorpsi glukosa baru.^{5,6} Pada studi in vivo hewan coba telah ditunjukkan bahwa pemberian *chlorogenic acid* akan mengurangi puncak *hyperglycemic* yang berasal dari glycogenolysis dengan adanya glucagon, suatu hormon *hyperglyceminant*.^{5,6} Studi tersebut juga menunjukkan berkurangnya kadar glukosa darah dan peningkatan kadar intrahepatik dari glucose-6-phosphate dan dari glikogen⁶.

Chlorogenic acid dibentuk bersama *caffeic acid* dan *quinic acid* yang merupakan antioksidan kuat secara *in vitro*.³⁶ *Chlorogenic acid* merupakan produk dari jalur phenylpropanoid, satu cabang dari metabolisme phenolik yang keberadaannya dirangsang oleh kondisi stress lingkungan seperti infeksi mikroba, luka mekanik, berlebihan paparan sinar ultra violet atau tingginya kadar cahaya.^{14,36} *Chlorogenic acid* terdapat pada berbagai macam buah-buahan, sayur-sayuran, kacang-kacangan atau polong-polongan.^{14,20,30} *Chlorogenic acid* di dalam kopi mempunyai aktivitas antioksidan yang potent secara *in vitro* dan mampu melindungi DNA, lipid

serta protein, juga mempengaruhi *signal transduction*, aktivasi faktor transkripsi, ekspresi gen, hepatoprotektif, hypoglikemik, aktivitas antivirus.^{5,6,14,26,27} *Chlorogenic acid* di dalam biji kopi hijau mengandung jumlah polyphenol terbanyak yang bertanggungjawab sebagai antioksidan dan secara *in vivo* mampu mengurangi risiko terjadinya penyakit kronik.^{14,20-23}

Selama pengolahan kopi, *chlorogenic acid* dapat mengalami *isomerisasi*, *hidrolisis*, atau *degradasi* menjadi senyawa dengan berat molekul lebih rendah. Suhu yang tinggi saat pemanggangan atau *roasting*, akan menghasilkan transformasi dari *chlorogenic acid* menjadi *quinolactone* dengan senyawa lain, melanoidin.^{14,21,37} Setelah mengalami proses *hidrolitik*,³⁷ maka total kandungan *phenolic acid* dari secangkir kopi yang berupa *caffeic acid* adalah $166 \pm 14\text{mg}$, *p-coumaric acid* $2,8 \pm 0,2\text{mg}$, *ferulic acid* $28,6 \pm 2,5\text{mg}$.^{20,30} Adanya 1,5-*quinolactones* telah diteliti memiliki efek hypoglikemi pada fungsi otak, terutama pada reseptor adenosine. Kandungan *chlorogenic acid* (*5'-caffeoyl quinic acid*, jumlah terbanyak) pada 10 gr kopi *brew* percangkir sekitar 15-325 mg, sedang pada kopi *brewed by drip filtering* kadarnya 200mg per cangkir.⁹ Kandungan antioksidan dalam secangkir kopi 200 ml adalah $95,8 \pm 4,6\text{mg}$ *chlorogenic acid* (*5'-caffeoylquinic acid*).³⁰

Faktor genetik, fisiologi dan faktor lingkungan saat prosesing mempengaruhi komposisi kimia kandungan biji kopi. Artinya, aktivitas antioksidan akan meningkat dengan adanya pemanggangan biji kopi selama 10 menit (*medium roasted coffee*) sehingga akan memproduksi kopi dengan

optimal *oxygen scavenging* dan *chain breaking activities* secara in vitro.²¹⁻²³ Dalam suatu studi dikatakan 200 ml cangkir kopi robusta mengandung 70 - 350 mg, sedang kopi arabica mengandung sekitar 70 - 200 mg *chlorogenic acid*.^{14,20} Diperkirakan bahwa peminum kopi akan mencerna 1 g per hari cinnamate esters (sebagian besar kandungannya adalah *chlorogenic acid*) dan 500 mg per hari cinnamates, yang sebagian besar mengandung *caffeic acid*.^{14,20,37}

Gugus utama *chlorogenic acid* ditemukan pada biji kopi hijau, sesuai indentitas kimia, nomor dan posisi dari *acyl residues*. Gugus senyawa tersebut adalah: *caffeoylquinic acids (CQA)*, *dicaFFEoylquinic acids (diCQA)*, *feruloylquinic acids (FQA)*, *p-coumaroylquinic acids (pCoQA)*, *caffeoyl-feruloyl quinic acids (CFAQ)* yang merupakan campuran diesters dari *caffeic* dan *ferulic acids* dengan *quinic acid*.³⁰

Studi tentang metabolisme *chlorogenic acid* menunjukkan bahwa *chlorogenic acid* yang tak dapat dicerna saat mencapai kolon akan dihidrolisa menjadi *caffeic acid* dan *quinic acid* oleh bakteri/mikroflora kolon.^{30,36} Dehidroksilasi oleh koloni mikroflora, absorpsi dan metabolisme di liver dan ginjal, maka terbentuklah *benzoic acid* yang akan dikonjugasi oleh *glycine* dan membentuk *hipuric acid*. Separuh dari *chlorogenic acid* yang dicerna akan muncul dalam urin sebagai *hipuric acid*. Metabolisme ini dipertimbangkan akan meminimalkan efek antioksidan secara in vivo karena

hipuric acid tidak mempunyai aktivitas antioksidan.^{30,36} Senyawa lain yang terkandung di dalam kopi selain *Chlorogenic acid* :³⁰

1. ***Hydroxy-cinnamic acids***

Senyawa ini merupakan *trans*-phenyl-3-propenoic acids dengan substitusi yang berbeda pada cincin aromatik dan yang paling banyak terdapat pada biji kopi adalah *caffeic acid*, *ferulic acid*, *p-coumaric acid*.³⁰

2. ***Caffeoylquinic acids*, *feruloylquinic acids* dan *dicafeoylquinic acids***

Senyawa ini termasuk kelompok utama *chlorogenic acid* yang ditemukan sedikit pada biji kopi dan *coffee pulp* (ampas/daging buah).^{30,36}

3. ***Tannin***

Senyawa ini merupakan senyawa phenolik yang terkandung dalam buah kopi. Kandungan *tannin* dapat rusak atau dikurangi dengan merendam ampas dalam air, serta larutan alkali, dan inokulasi dengan mikroorganisme terseleksi.³⁰ *Tannin* ditemukan pada pemrosesan kering sebagai residu dari *coffee pulp*, namun tidak ditemukan pada pemrosesan biji kopi cara basah. *Tannin* merupakan senyawa phenolik utama pada buah kopi, sedang pada biji kopi *tannin* terutama sebagai keluarga ester yang terbentuk antara *hydroxycinnamic acids* dan *quinic acid*, secara bersama-sama disebut *chlorogenic acid*.^{30,36,37}

4. ***Anthocyanidin***³⁰

Anthocyanidin seperti *cyanidin*, *pelargonidin* dan *l-peonidin* diidentifikasi pada biji kopi arabika 1 % *phenolic glycosides*.

5. *Lignan*³⁸

Termasuk senyawa ini adalah *secoisolariciresinol*, *lariciresinol*, *matairesinol* dan *pinoresinol*. Lignan merupakan antioksidan larut lemak seperti *sesamolinal* dan *sesamolin*. Perannya mencegah terbentuknya radikal bebas, dan membersihkan radikal bebas yang telah siap terbentuk. Lignan merupakan phytoestrogen dengan estrogenik. Lignan ditemukan dalam berbagai sumber bahan makanan, termasuk kopi. Senyawa phenolik seperti lignan dan *anthocyanins* terdapat pada biji kopi dalam jumlah kecil.

Kopi hijau dan hitam mengandung antioksidan total sebanyak 15,9 dan 22,6 mmol dalam 100gr. Perbedaan antara biji kopi hijau dan hitam menurut data yang ada sebelumnya bahwa beberapa antioksidan cenderung rusak saat proses *roasting* namun terbentuk reaksi lain yaitu *Maillard reactions (the browning reaction)* dimana reaksi ini juga menimbulkan antioksidan.³⁹⁻

⁴¹Beberapa penelitian menunjukkan bioaktivitas dari kopi yang berkontribusi terhadap antioksidan pada kopi. Banyak studi menyatakan bahwa kopi mengurangi plasma *gamma-glutamyl transpeptidase(γ-GT)*, yang merupakan *biomarker* awal adanya *oxidative stress*.²³ Pada *roasting of coffee beans* akan meningkatkan kadar aktivitas antioksidan total karena akan memproduksi kopi dengan *optimal oxygen scavenging* serta *chain breaking activities in vitro*.^{22,23} Hasil studi pada kopi robusta dan arabika di 6 negara menunjukkan efek protektif lebih banyak pada kopi *raosted* daripada kopi hijau.^{23,32,39-}

⁴¹Selama *roasting of coffee beans* akan terbentuk melanoidin yang

merupakan polymer warna coklat, yang terbentuk melalui reaksi Maillard yang bermakna terhadap aktivitas antioxidant secara *in vitro*.³⁹⁻⁴¹

2.2. Asam urat

Asam urat ditemukan pertama kali oleh Scheele tahun 1776 dan merupakan produk akhir dari metabolisme nitrogen pada burung dan hewan melata, bisa ditemukan pada hasil ekskresi kedua jenis hewan tersebut dan pada urine hewan pemakan daging.^{29,33,34}

2.2.1. Pengertian asam urat

Asam urat adalah produk akhir atau produk buangan yang dihasilkan dari metabolisme/pemecahan purin. Asam urat sebenarnya merupakan antioksidan dari manusia dan hewan, tetapi bila dalam jumlah berlebihan dalam darah atau mencapai kadar *saturated* akan mengalami pengkristalan dan dapat menimbulkan gout.^{18,39}

Asam urat mempunyai peran sebagai antioksidan bila kadarnya tidak berlebihan dalam darah, namun bila kadarnya berlebihan dalam darah, asam urat akan berperan sebagai prooksidan. Pada kondisi hiperurikemi akan merangsang terjadinya stres oksidatif dan menyebabkan sindrom metabolik.^{39,40}

Kadar asam urat diketahui melalui hasil pemeriksaan darah dan urin. Nilai rujukan kadar asam urat normal dalam darah pria adalah 2,1-7 mg/dL dan pada perempuan adalah 2,0-6 mg/dL. Kadarnya akan meningkat pada

orangtua, sedang nilai rujukan kadar asam urat normal pada urin adalah 250-750 mg/24 jam.^{29,43} Menurut *American Medical Association*, kadar asam urat normal antara 3,6 mg/dL – 8,3 mgdL (1 mg/dL = 59,48 μ mol/L)^{42,43}

2.2.2. Sifat dan struktur kimia asam urat

Asam urat merupakan asam lemah organik dengan pKa 5,8.^{33,34} Pada pH dibawah pKa akan membentuk molekul *nonionized* sehingga sulit larut air. Dalam bentuk ion akan lebih mudah larut air daripada dalam bentuk molekul *nonionized*. Ion urat terutama terbentuk pada pH 7,4. Ion urat difiltrasi di glomerulus.⁴²⁻⁴⁶

Asam urat berwarna putih, berbau busuk dan merupakan substansi yang terbentuk dari hasil degradasi purin pada manusia, primata, dalmatian, burung, ular dan cicak serta dapat dihilangkan dari tubuh dalam bentuk *dry powder*.⁴³



Gambar5. Struktur kimia asam urat⁴⁶

Asam urat adalah senyawa alkaloida turunan purin (*xanthine*).⁴³ Asam urat merupakan senyawa organik semisolid yang terdiri dari *carbon*, *nitrogen*, *oxygen* dan *hydrogen* dengan formula $C_5H_4N_4O_3$, yang merupakan *nitrogenous* akhir dari metabolisme protein dan purine.^{42,43}

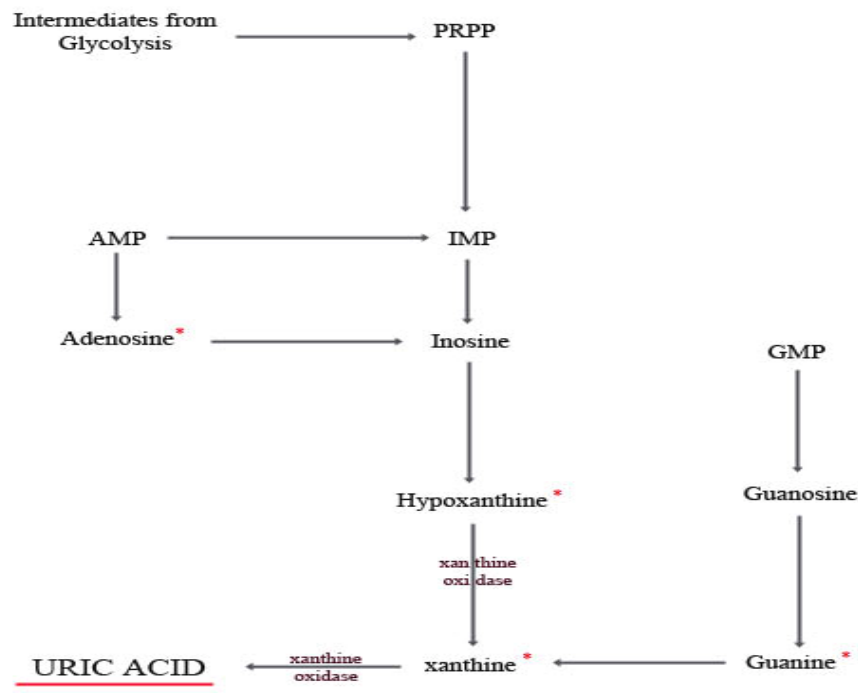
2.2.3 Metabolisme asam urat

Asam urat merupakan produk akhir metabolisme purin, dimana purin berasal dari metabolisme dalam tubuh/ faktor *endogen* (genetik) dan berasal dari luar tubuh/ faktor *eksogen* (sumber makanan).^{29,43} Asam urat dihasilkan oleh setiap makhluk hidup sebagai hasil dari proses metabolisme sel yang berfungsi untuk memelihara kelangsungan hidup.²⁹

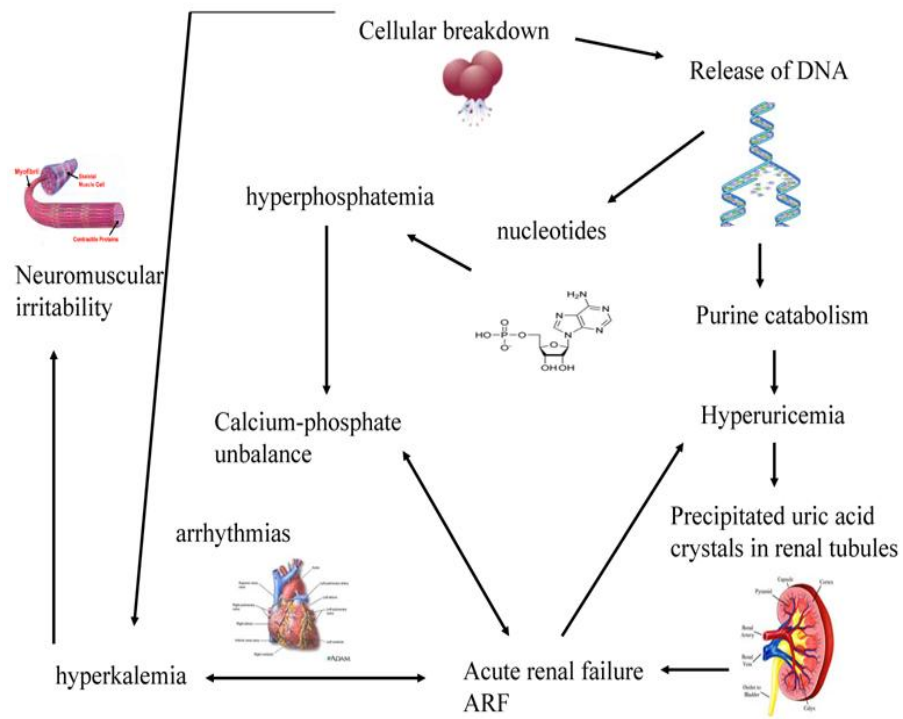
Makanan tinggi purin dari produk hewani seperti sardine, hati ayam, hati sapi, ginjal sapi, otak, daging, *herring*, *mackerel*, unggas, ikan, akan dapat meningkatkan kadar asam urat, apalagi bila hampir setiap hari dikonsumsi dalam jumlah berlebihan.⁴² Makanan dengan kandungan purin sedang contohnya *seafood*, daging sapi, asparagus, kembang kol, bayam, jamur, *wheat germ*. Makanan dengan kandungan tinggi purin tidak selalu berhubungan dengan peningkatan risiko gout demikian juga makanan dengan tinggi fruktose (terdapat pada produk makanan olahan dan minuman soda) apalagi bila tidak dikonsumsi dalam jumlah yang berlebihan. Asam urat diekskresikan lewat ginjal setiap hari, sisanya diekskresikan lewat feses. Eliminasi melalui jalur enterik (25-35%) dan jalur renal (65-75%). Kadar asam urat bervariasi setiap hari. Adanya gangguan dalam proses ekskresi akan menyebabkan penumpukan asam urat.^{42,44}

Jalur kompleks pembentukan asam urat dimulai dari ribose 5-phosphate, suatu pentose yang berasal dari *glycolic metabolism*, dirubah menjadi *PRPP* (*phosphoribosyl pyrophosphate*) dan kemudian

phosphoribosilamine, lalu ditransformasi menjadi *inosine monophosphate (IMP)*. Dari senyawa perantara yang berasal dari *adenosine monophosphate (AMP)* dan *guanosine monophosphate (GMP)*, *purinic nucleotides* digunakan untuk sintesis DNA dan RNA, serta inosine yang kemudian akan mengalami degradasi menjadi hypoxanthine, xanthine dan akhirnya menjadi *uric acid*.^{29,44} Hypoxanthine dan guanine memasuki jalur *salvage*, menggunakan *hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HGPRT)*, suatu enzim yang merubah basa purin menjadi nukleotida. Produk sampingan dari reaksi tersebut adalah *hydrogen peroxide (H₂O₂)*, yang toksik untuk ginjal dan akan dirubah menjadi H₂O dan O₂ oleh *catalase*.⁴³



Gambar 6. Penguraian Basa Purin¹⁸



Gambar7. Penguraian Basa Purin Melalui *Cellular Breakdown*⁴⁴

Peningkatan kadar asam urat (Hiperurikemia)

Beberapa hal di bawah ini menyebabkan peningkatan kadar asam urat dalam tubuh :^{18,42,45}

1. Kandungan makanan tinggi purin karena meningkatkan produk asam urat dan kandungan minuman tinggi fruktose.
2. Ekskresi asam urat berkurang karena fungsi ginjal terganggu misalnya kegagalan fungsi glomerulus atau adanya obstruksi sehingga kadar asam urat dalam darah meningkat. Kondisi ini disebut hiperurikemia, dan

dapat membentuk kristal asam urat/ batu ginjal yang akan membentuk sumbatan pada ureter.

3. Penyakit tertentu seperti gout, *Lesch-Nyhan syndrome*, *endogenous nucleic acid metabolism*, kanker, kadar abnormal eritrosit dalam darah karena destruksi sel darah merah, polisitemia, anemia perniosa, leukemia, gangguan genetik metabolisme purin, gangguan metabolik asam urat bawaan (peningkatan sintesis asam urat endogen), alkoholisme yang meningkatkan laktikasidemia, hipertrigliseridemia, gangguan pada fungsi ginjal dan obesitas, asidosis ketotik, asidosis laktat, ketoacidosis, lacticidosis, dan psoriasis.⁴⁵
4. Pemakaian obat-obatan diuretik seperti tiazid atau furosemid akan meningkatkan ekskresi cairan tubuh, namun menurunkan ekskresi asam urat pada tubulus ginjal sehingga terjadi peningkatan kadar asam urat dalam darah.¹⁶
5. Pada pemakaian hormonal untuk terapi seperti hormon adrenokortikotropik dan kortikosteroid.¹⁶
6. Pada keadaan lapar/starvasi selama proses akuta dapat juga terjadi peningkatan kadar asam urat dalam darah karena terjadi pemecahan sel yang lebih cepat serta adanya ketoasidosis.^{16,44}
7. Kemoterapi kanker (*chemotherapy-induced tumor lisis*) serta pemakaian obat-obatan seperti sitostatika akan terjadi peningkatan katabolik dari

protein sehingga inti sel akan mengalami pemecahan lebih cepat dan terjadilah peningkatan kadar asam urat dalam darah.⁴⁵

Penurunan kadar asam urat

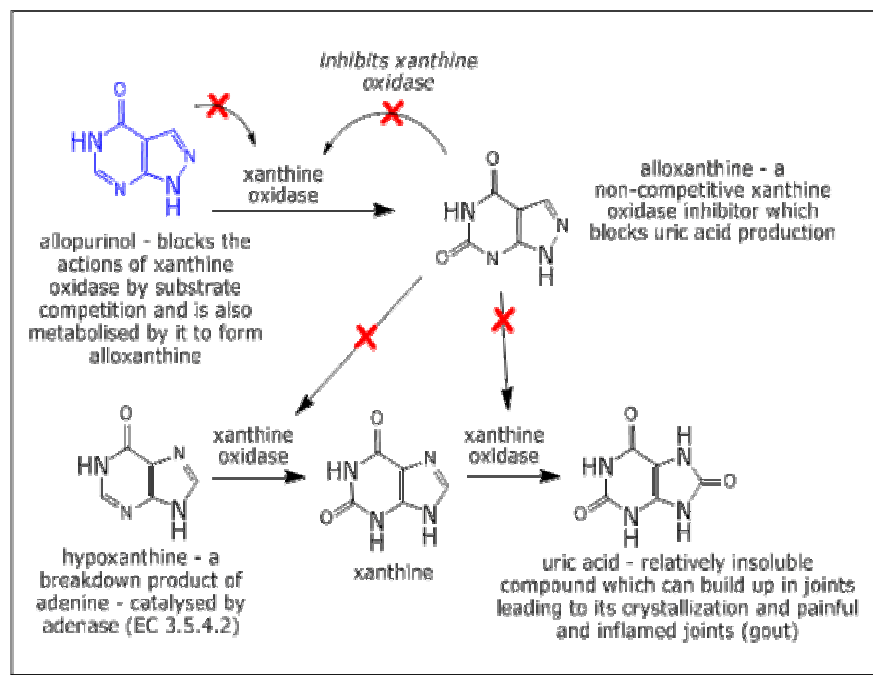
Beberapa kondisi yang menyebabkan terjadinya penurunan kadar asam urat : ^{43,44}

1. Kegagalan fungsi tubulus ginjal dalam melakukan reabsorpsi asam urat dari tubulus ginjal, sehingga ekskresi asam urat melalui ginjal akan ditingkatkan dan kadar asam urat dalam darah akan turun. Kegagalan fungsi ginjal untuk berfungsi secara normal akan menyebabkan terjadinya retensi produk buangan dari metabolisme protein, sehingga terjadi penumpukan asam urat, urea, serta senyawa nitrogen seperti kreatinin.
2. Defisiensi xanthine oksidase serta hambatan aktivitas enzim xanthine oxidase dalam pembentukan asam urat sehingga akan mengurangi kadar asam urat.¹⁸
3. Rendahnya kadar tiroid, penyakit ginjal kronik, toksemia kehamilan dan *alcoholism*.
4. Pemberian obat-obatan penurun kadar asam urat.

Secara medis, selama ini terapi penurunan kadar asam urat dilakukan dengan pemberian obat-obatan yang meningkatkan ekskresi asam urat atau menghambat pembentukan asam urat seperti allopurinol, dimana cara kerja allopurinol dengan menghambat kerja xanthine oksidase.¹⁸

Allopurinol secara struktur kimia merupakan analog struktur dari hypoxanthin, maka allopurinol adalah analog substrat untuk enzim xanthin

oxidase. Jadi di sini, fungsi allopurinol sebagai analog sustrat akan menempati sisi aktif enzim xanthine oxidase, yang biasa ditempati oleh hypoxanthine.¹⁸ Allopurinol menghambat aktivitas enzim secara *irreversible* dengan mengurangi bentuk *xanthin oxidase* sehingga menghambat pembentukan asam urat.



Gambar 8. Skema penghambatan xanthin oxidase terhadap pembentukan asam urat¹⁸

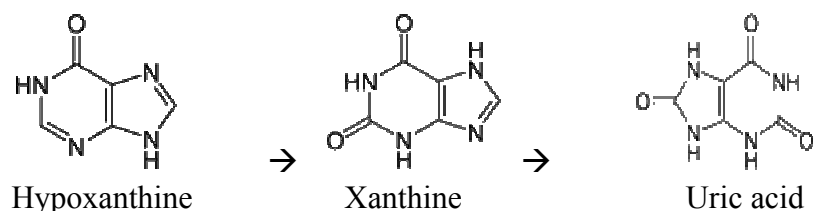
Xanthine oxidase adalah enzim yang mereduksi O_2 menjadi H_2O_2 dalam sitosol dan diperkirakan faktor utama dalam cedera iskemia terutama pada sel mukosa usus.^{18,47-49} Xanthine oxidase merupakan homodimer katalitik subunit independent, adalah enzim yang mengkatalisis hipoxanthin menjadi xanthin dan xanthin menjadi asam urat, yang merupakan jalur degradasi purin.

^{18,47,49}Pada jaringan normal, xanthin oxidase merupakan suatu dehidrogenase yang menggunakan NAD sebagai akseptor elektron dalam jalur degradasi purin. Adanya penurunan fosforilasi ADP menjadi ATP karena tak ada O₂ maka terjadi degradasi ADP dan basa yang diubah menjadi hipoxanthin, kemudian xanthin dehidrogenase diubah menjadi xanthin oxidase. Jadi dalam kondisi tubuh kekurangan O₂, kemungkinan banyak terjadi degradasi ADP dan basa menjadi xanthin oxidase.¹⁸ Xanthine oxidase melakukan *oxidizes oxypurine* seperti xanthine dan hypoxanthine menjadi asam urat. Jadi segala sesuatu defek pada metabolisme purin akan menghasilkan asam urat dan akan menyebabkan terjadi deposit *sodium hydrogen urate monohydrate crystal*.⁴⁹ Pada individu dengan kondisi kekurangan atau ketiadaan O₂ maka tubuh akan membentuk xanthin oxidase melalui degradasi ADP dan basa, apalagi individu dengan asupan tinggi purin akan lebih mudah membentuk asam urat. Bila kadar *alkaloida* tinggi dalam darah, adanya enzim *xanhtin oxidase* akan membentuk asam urat.¹⁸

Struktur protein yang terkandung di dalam xanthin oxidase cukup besar dengan berat molekul 270.000 dan mempunyai 2 molekul flavin yang terikat sebagai FAD, 2 atom molybdenum, 8 atom besi yang terikat per unit enzimatik. Atom molybdenum mengandung kofaktor molybdopterin dan tempat aktif enzim xanthin oxidase. Atom besi merupakan bagian dari 2Fe-2S ferredoxin iron-sulfur cluster dan berpartisipasi dalam reaksi transfer elektron.

Urutan reaksi pembentukan asam urat sebagai berikut :

- $\text{hypoxanthine} + \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{xanthine} + \text{H}_2\text{O}_2$
- $\text{xanthine} + \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{uric acid} + \text{H}_2\text{O}_2$



Gambar 9. Perubahan struktur kimia dari reaksi di atas sehingga terbentuk asam urat⁴⁹

Tempat aktif xanthine oxidase

Tempat aktif xanthine oxidase tersusun atas unit molybdopterin dengan atom molybdenum yang dikoordinasi oleh terminal oksigen, atom sulfur, dan terminal hydroxide. Pada reaksi xanthine untuk membentuk asam urat, atom oksigen ditransfer dari molybdenum menjadi xanthine. Reformasi dari *active molybdenum center* terjadi melalui penambahan air. Molybdenum mengandung enzim oxidoreductases, sehingga atom oxygen akan mengenal substrat xanthin oxydase asli yang berasal dari air.^{47,49,50}

2.3. Antioksidan

Antioksidan adalah senyawa pemberi elektron dan merupakan senyawa yang mampu menetralkan akibat dari oksidan. Adanya peningkatan spesies oksigen aktif atau radikal bebas dapat menimbulkan stres oksidatif. Peningkatan radikal bebas di dalam sel sebagai akibat paparan dari stres lingkungan. Sistem antioksidatif pada tanaman tingkat tinggi diantaranya

terdiri dari enzim dan senyawa dengan berat molekul rendah (diantaranya flavonoid, senyawa fenolik dan alkaloid).^{18,26,51,52} Dalam melakukan tugasnya, antioksidan akan mencegah akumulasi oksidan berlebihan, mencegah terjadinya radikal hidroksil dan mencegah berlanjutnya reaksi rantai oksidan atau radikal bebas dengan jalan memutus rantai.^{18,51} Antioksidan akan melindungi jaringan dari efek negatif radikal bebas. Menurut cara kerjanya antioksidan terdiri atas : ^{18,51}

1. *Primary Antioksidant Defence*

Antioksidan akan mengurangi efek negatif dari radikal bebas yang sudah ada, contoh antioksidan akan merubah $O_2^{\bullet -}$ yang sudah ada menjadi hidrogen peroksida (H_2O_2) dan merubah Glutathion Peroksidase (GPx) menjadi hidrogen peroksida.

2. *Secondary Antioksidant Defence*

Antioksidan akan menangkap radikal bebas dan mencegah reaksi berantai dari radikal bebas. Asam urat merupakan salah satu antioksidan sekunder dalam tubuh. Artinya dalam kadar normal, asam urat akan mampu menangkap radikal bebas yang ada di dalam tubuh, namun dalam jumlah berlebihan akan memberikan efek negatif bagi tubuh.

3. *Tertiary Antioksidant Defence*

Antioksidan yang memperbaiki kerusakan molekuler akibat radikal bebas, contoh : memperbaiki kerusakan enzim metionin sulfoksida reduktase (enzim yang bertugas untuk *repair DNA*).

Aktivitas antioksidan di dalam kopi terhadap produksi asam urat

Senyawa polifenol terkandung di dalam kopi dan mempunyai aktivitas sebagai antioksidan.⁵²⁻⁵⁴ Bila tubuh mengkonsumsi makanan dengan kandungan senyawa polifenol, maka tubuh akan mendapatkan antioksidan tersebut dengan tetap mempertimbangkan proses pengolahan dan penyajian kopi.^{52,55,56} Kandungan kopi yang telah teridentifikasi sebagai antioksidan adalah *chlorogenic acid* dan merupakan kontributor utama antioksidan.^{14,21-23} Selain itu senyawa tersebut berperan menghambat aktivitas xanthine oxidase dan reaksi superoksida sehingga kadar asam urat menurun.^{21-23,35,51} Senyawa polifenol juga bersifat diuretik, sehingga asam urat akan larut dan terbuang bersama urin.^{14,20}

Selain kandungan kopi bekerja sebagai antioksidan primer, mekanisme inhibisi terjadi kemungkinan karena adanya kemiripan struktur kimia senyawa polifenol dengan turunan xanthin yang berasal dari degradasi kafein dan yang berasal dari metabolisme makanan (purin).^{36,56}

Senyawa polifenol (diantaranya *chlorogenic acid*) kopi mampu menghambat kerja enzim xanthin oxidase.^{36,56} Demikian pula senyawa lain seperti *caffeic acid*.³⁶ Hal tersebut kemungkinan struktur senyawa tersebut mempunyai kemiripan sehingga aktivitas biologinya mampu menghambat xanthin oxidase,^{36,54,56} seperti cara kerja allopurinol dalam menurunkan kadar asam urat dengan menggunakan jalur penghambatan enzim xanthin oxidase.¹⁸ Menurut hasil studi kapasitas antioksidan plasma dalam tubuh

manusia meningkat setelah mengonsumsi kopi karena adanya kandungan senyawa polifenol di dalam kopi.⁵² Hasil studi lain menyatakan adanya *Maillard Reaction* menghasilkan melanoidin yang poten sebagai antioksidan.^{39,40} Hasil dari penelitian lain menyatakan adanya kemampuan *radical scavenging* secara invitro (setelah dilakukan pengukuran kadar aktivitas antioksidan) pada kopi robusta dan arabika yang dipanggang pada suhu 236 derajat Celcius, namun kemampuannya sebagai *radical scavenging* menurun bila pemanggangan terlalu lama.⁴¹ Hasil penelitian lain menyatakan bahwa *chlorogenic acid* yang merupakan salah satu antioksidan poten dari senyawa fenolik ternyata mampu menghambat aktivitas xanthin oxidase.⁵⁶

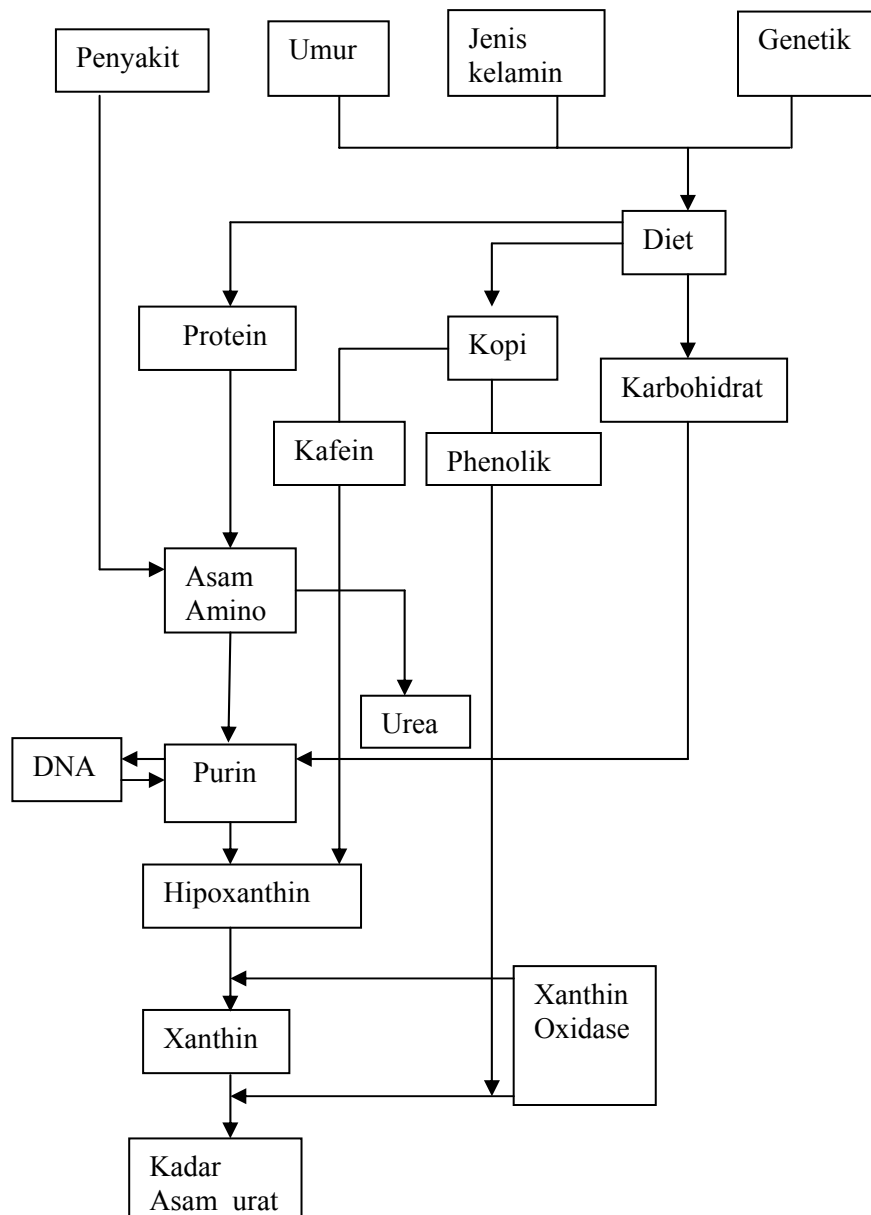
BAB 3

KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS

PENELITIAN

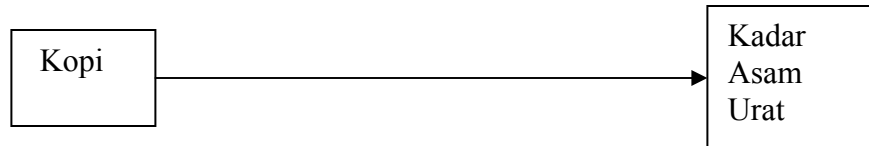
3.1 Kerangka Teori

Berdasarkan teori dari berbagai pustaka, maka disusun kerangka teori sebagai berikut :



3.2 Kerangka Konsep

Berdasarkan kerangka teori maka disusun kerangka konsep sebagai berikut :



3.3 Hipotesis

3.3.1 Hipotesis mayor :

Kopi menurunkan kadar asam urat serum darah tikus hiperurikemia

3.3.2 Hipotesis minor :

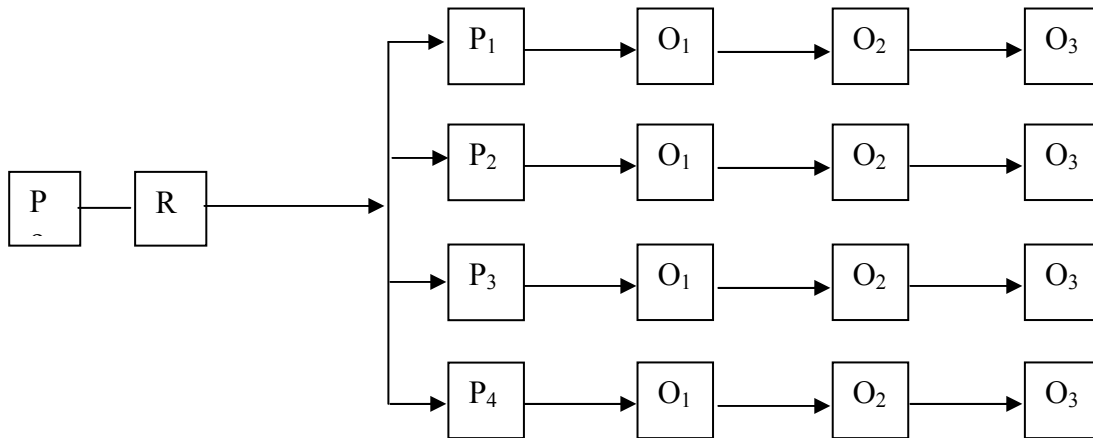
1. Kadar asam urat serum darah hewan coba *Rattus Norwegicus Galur Wistar* yang mendapat pakan tinggi purin dan kopi selama 7 hari setelah pemberian kopi lebih rendah dibanding sebelum pemberian kopi
2. Penurunan kadar asam urat serum darah hewan coba *Rattus Norwegicus Galur Wistar* yang diberi kopi dosis lebih tinggi lebih besar dibanding kelompok yang diberi kopi dosis lebih rendah

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental (*true experiment designs*) dengan rancangan *pre and post test group design*, menggunakan 4 kelompok perlakuan, dengan randomisasi sederhana.



Keterangan :

P=Populasi

R=Randomisasi

P=Perlakuan

P₁ = pakan tinggi purin, pemberian 0,36ml larutan kopi/hari

P₂ = pakan tinggi purin + pemberian 0,72ml larutan kopi/hari

P₃ = pakan tinggi purin + pemberian 1,44ml larutan kopi/hari

P₄ = pakan tinggi purin + pemberian 2,16ml larutan kopi/hari

4.2. Populasi dan Sampel

Populasi

Populasi hewan percobaan adalah tikus jantan (*Rattus Norwegicus Galur Wistar*) yang berasal dari Layanan Penelitian Pra Klinik dan Pengembangan Hewan Percobaan Laboratorium MIPA Biologi UNNES.

Sampel

Besar sampel tiap kelompok perlakuan minimal 5 ekor (sesuai besar sampel tiap kelompok menurut WHO tahun 1975 minimal adalah 5 ekor).^{57,58}

Bila besar *drop-out* diiperkirakan sebesar 10% ($d.o=0,1$), maka besar sampel minimal adalah: $n_{do} = 5 / (1-d.o)^2 = 5 / (1-0,1)^2 = 5 / 0,81 = 6,2 \approx 6$. Penelitian ini dilakukan pada 4 kelompok perlakuan, masing-masing kelompok terdiri dari 6 ekor sehingga jumlah sampel total adalah 24 ekor.

Pembagian tikus dilakukan secara random sederhana menjadi 4 kelompok penelitian, dengan cara memberi nomor pada ekor tikus kemudian pengambilan nomor melalui lotere.

4.3. Kriteria Inklusi

1. Kondisi sehat (lincah)^{58,59}
2. Tidak ada kelainan anatomis
3. Berat badan tikus normal 180-200gram pada umur 10 minggu^{58,59}

4.4. Kriteria Eksklusi

1. Tikus mengalami diare

4.5. Variabel Penelitian

4.5.1. Klasifikasi Variabel

Variabel bebas : Kopi dengan berbagai dosis

Variabel tergantung : kadar asam urat serum darah tikus wistar

Variabel perancu : usia, jenis kelamin (telah dikendalikan)

4.5.2. Definisi Operasional Variabel

Variabel	Definisi Operasional Variabel	Satuan	Skala
Kopi dengan berbagai dosis	Bubuk kopi murni jenis robusta yang sebelumnya telah disangrai selama 10 menit pada suhu $236^{\circ}\text{C}^{21-23}$ dan ditumbuk sampai halus, kemudian dijadikan larutan kopi dan diberikan dalam volume 3ml untuk 1 kali pemberian perhari. Variasi dosis kopi bertingkat. Dosis pemberian kopi: Kelompok P ₁ : 0,36 mL larutan kopi Kelompok P ₂ : 0,72 mL larutan kopi Kelompok P ₃ : 1,44 mL larutan kopi Kelompok P ₄ : 2,16 mL larutan kopi	Gram	Skala ordinal
Kadar Asam Urat	Hasil pengukuran kadar asam urat serum darah tikus yang diambil dari plexus retro orbitalis menggunakan tabung hematokrit sebanyak $\pm 0,5$ ml dan ditampung di dalam tabung reaksi, kemudian disentrifuge dan diukur menggunakan spektrofotometri.. Kadar asam urat:	mg/dL	Skala Rasio

Variabel	Definisi Operasional Variabel	Satuan	Skala
	<ul style="list-style-type: none"> - Awal: Kadar asam urat setelah pemberian pakan standar selama 7 hari, sebelum mendapat diet tinggi purin - Sebelum: Kadar asam urat setelah pemberian diet tinggi purin selama 7 hari, sebelum pemberian kopi - Sesudah: Kadar asam urat setelah pemberian diet tinggi purin dan kopi selama 7 hari 		

4.6. Perhitungan Dosis

Pemberian dosis kopi dengan menggunakan tabel perbandingan luas permukaan tubuh hewan coba, dimana dosis tikus dengan berat badan 200g adalah 0,018 dosis manusia.^{57,58} Menurut penelitian sebelumnya, konsumsi kopi yang mampu menurunkan kadar asam urat adalah 3-5 cangkir kopi sehari, dimana 1 cangkir kopi per hari 200ml dengan 10g bubuk kopi robusta yang mengandung 100mg kafein dan 200mg *chlorogenic acid*.^{11-13,20,28}

Pada manusia, di dalam 1 cangkir kopi 200ml air mengandung 10g bubuk kopi (konsentrasi 1 kali), dan dosis konversi banyaknya volume larutan untuk tikus yang setara dengan 200ml air $\sim 0,018 \times 200\text{ml}$ adalah 3,6ml. Untuk 2 cangkir kopi setara dengan

7,2ml; sedang untuk 4 cangkir kopi setara dengan 14,4ml; dan untuk 6 cangkir kopi setara dengan 21,6ml.

Pada penelitian ini dibuat larutan 100g bubuk kopi (konsentrasi 10 kali) yang diseduh dalam 200ml. Banyaknya volume air yang boleh diberikan pada tikus maksimal adalah 5ml,^{57,58} sehingga dalam penelitian ini volume larutan kopi yang digunakan sebagai berikut :

Kelompok perlakuan 1 (P₁): diet tinggi purin + 0,36 ml larutan kopi + aqua, menjadi larutan 3ml

Kelompok perlakuan 2 (P₂): diet tinggi purin + 0,72 ml larutan kopi + aqua, menjadi larutan 3ml

Kelompok perlakuan 3(P₃): diet tinggi purin + 1,44 ml larutan kopi + aqua, menjadi larutan 3ml

Kelompok perlakuan 4(P₄): diet tinggi purin + 2,16 ml larutan kopi + aqua, menjadi larutan 3ml

Berdasarkan dosis tersebut, maka dosis minimal yang digunakan pada penelitian ini adalah 0,36 ml larutan kopi yang setara dengan 1 cangkir kopi. Bubuk kopi diberikan dengan menyeduh memakai air hangat lalu diberikan pada tikus melalui sonde, dengan volume 3 ml setiap kali pemberian.

4.7. Alat dan Bahan

4.7.1. Alat

1. Kandang tikus individual, beserta perlengkapannya
2. Timbangan hewan percobaan OHAUS , dan timbangan analitik
3. Sonde lambung
4. Spektrofotometer Coleman dengan perlengkapannya
sentrifuse, pipet, tabung reaksi, tabung eppendrof, *ice bath*,
alat-alat gelas biasa.

4.7.2 Bahan

1. Tikus jantan galur Wistar 10 minggu, berat 180-200 gram atau memenuhi kriteria inklusi
2. Pakan tikus standar CP12 dan air minum
3. Bubuk kopi robusta murni.
4. Bahan untuk pemeriksaan kadar asam urat : sampel darah serum sebanyak 0,5 ml yang diambil menggunakan tabung hematokrit dari plexus retro orbitalis yang ditampung dalam tabung reaksi.

4.8. Prosedur Penelitian

4.8.1. Persiapan Hewan Coba

Hewan percobaan dipelihara dalam kandang per kelompok pada suhu 28-32⁰ C. Penelitian diawali dengan mempersiapkan tikus jantan wistar usia 10 minggu, berjumlah 24 ekor yang

diaklimatisasi selama 7 hari dengan pemberian pakan standar CP12 secara *ad libitum*.

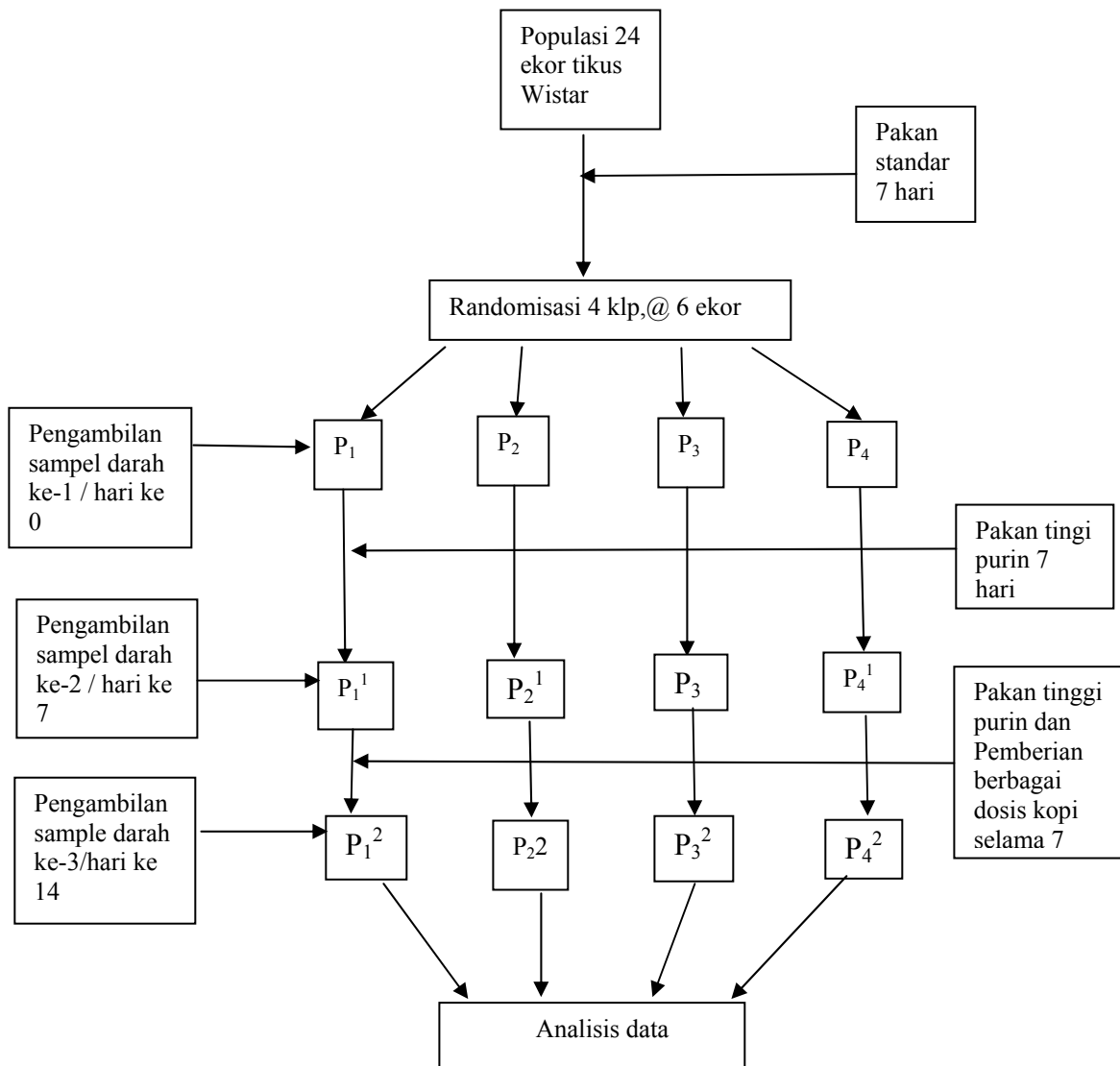
Kemudian dikelompokkan secara acak menjadi 4 kelompok, tiap kelompok terdiri dari 6 ekor lalu kadar asam urat awal setelah pemberian pakan standar diukur sebagai data standar (*observasi pertama*). Setelah itu diberikan diet tinggi purin selama 7 hari dan diperiksa kembali kadar asam uratnya (*observasi kedua*). Selanjutnya diberikan larutan berbagai dosis kopi dan kemudian diukur kadar asam urat akhir sebagai data akhir penelitian (*observasi ketiga*). Pemberian larutan kopi dengan cara sonde lambung, sedang pemberian pakan standar, diet tinggi purin dan air minum *ad libitum*.

4.8.2. Persiapan Pakan

Pakan standar menggunakan diet murni CP12. Ransum pakan standar adalah makanan standar (100% pakan standar) bagi semua tikus yang diberikan selama 7 hari pada masa adaptasi. Selanjutnya, selama penelitian diberikan diet tinggi purin berupa otak kambing (komposisi 50% pakan standar, 50% otak kambing) selama 7 hari pada kelompok perlakuan dan pada kelompok kontrol menggunakan pakan standar. Kemudian, pada minggu selanjutnya, selama 7 hari diberikan larutan berbagai dosis kopi dan pakan tinggi purin pada kelompok

perlakuan, sedang pada kelompok kontrol hanya diberikan larutan aqua dan pakan standar.

4.8.3. Alur Kerja Penelitian



Keterangan :

P₁ = pakan tinggi purin, pemberian 0,36ml larutan kopi/hari + aqua sehingga menjadi larutan 3ml.
 P₂ = pakan tinggi purin + pemberian 0,72ml larutan kopi/hari + aqua sehingga menjadi larutan 3ml .
 P₃ = pakan tinggi purin + pemberian 1,44ml larutan kopi/hari + aqua sehingga menjadi larutan 3ml .
 P₄ = pakan tinggi purin + pemberian 2,16ml larutan kopi/hari + aqua sehingga menjadi larutan 3ml .

Penelitian dilakukan selama 14 hari. Pada hari ke-1, ke-7, dan ke-14 diperiksa kadar asam urat dalam darah.

Penelitian berlangsung selama bulan Maret-April 2008 laboratorium MIPA Biologi UNNES, laboratorium Farmakologi FK Undip.

4.10. Analisis Data

Sebelum dilakukan analisis, pada data yang terkumpul dilakukan pemeriksaan kelengkapan data, koding dan data ditabulasi lalu dimasukkan ke dalam komputer. Analisis data meliputi analisis statistik deskriptif dan analisis statistik inferensial. Pada analisis deskriptif data kadar asam urat serum darah dinyatakan sebagai rerata dan simpang baku atau median apabila distribusinya tidak normal. Data juga disajikan dalam bentuk tabel dan gambar.

Uji normalitas distribusi data menggunakan uji Saphiro-Wilks oleh karena jumlah sampel kecil, selain itu data berdistribusi normal, maka perbedaan kadar asam urat sebelum dengan setelah pemberian kopi diuji dengan uji *t*-berpasangan. Perbedaan kadar asam urat serum darah setelah pemberian berbagai dosis kopi diuji dengan *One Way* ANOVA dan dilanjutkan dengan uji Post Hoc Bonferroni. Perbedaan perubahan kadar asam urat serum darah (selisih kadar asam urat serum darah *pre* dengan *post* perlakuan) diuji dengan *One Way* ANOVA dan dilanjutkan dengan uji *Post Hoc* LSD. Perbedaan dianggap bermakna apabila nilai $p < 0,05$ dengan 95% interval kepercayaan. Analisis statistik menggunakan program *SPSS for Windows v.16.01 (SPSS Inc, USA)*.

dcccxix

